

TESTAJE *in vitro* DE GENOTIPOS ADULTOS DE *Castanea sativa* Mill. POR SU RESISTENCIA A *Phytophthora cinnamomi*



Beatriz Cuenca¹, Cristina Rial², Cristina Pintos², M. Carmen Salinero² y Pedro Mansilla²

¹ TRAGSA. Departamento de Mejora Agroforestal. Crta. Maceda-Valdrey, km. 2. 32700 Maceda. Ourense. bcuenca@tragsa.es

² Estación Fitopatológica do Areiro (Diputación de Pontevedra). Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. efa@efa-dip.org

Introducción

Durante los años 2007 y 2008, la empresa TRAGSA y la Estación de Fitopatología do Areiro en colaboración desarrollaron un test *in vitro* para evaluar la respuesta de los explantos de *Castanea sativa* a la inoculación con *Phytophthora cinnamomi* (Rial y col, 2007; Cuenca y col., 2009). El objetivo es poder confirmar la resistencia a la enfermedad de la tinta en castaños seleccionados en campo por su aparente tolerancia al hongo, en un tiempo inferior al requerido para llevar a cabo el test de inoculación al sustrato, para el que es necesario disponer de planta aclimatada.

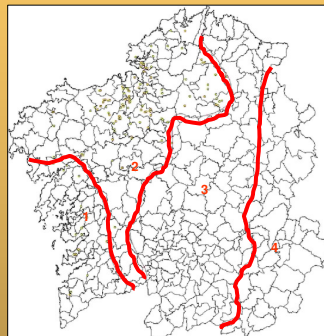


Figura 1. Áreas de regresión según Bouhier (1979). 1. Entre 1525-1750; 2. Entre 1750-1850; 3. Entre 1850 y 1980; 4. Poco perturbado. ● Pies seleccionados por TRAGSA

Validación del test (Cuenca y col., 2009)

Los síntomas en este test se manifiestan muy pronto, en torno al día 7, y la muerte alcanza al 100% de los explantos por lo que la supervivencia no es la variable adecuada para estimar la resistencia. Las variables medidas fueron:

- * progreso de la enfermedad como nº de días transcurridos hasta el 100% de las muertes
- * % de reasamiento positivo en raíz y tallo

Se compararon los resultados *in vitro* para 10 genotipos diferentes además de *C. sativa* (RP2) y *C. crenata*, con los obtenidos en el test de inoculación del sustrato.

Tabla 1. Coeficientes de correlación entre las variables del test *in vitro* y de inoculación al sustrato

Test <i>in vitro</i>	Días hasta el 100% de las muertes	Test de inoculación al sustrato			
		Supervivencia (%)	Nivel de daño en la raíz	Circunferencia de daño en el cuello de la raíz (%)	Índice de progreso de la enfermedad (%/día)
		0,43 n.s	(-) 0,43 n.s	(-) 0,42 n.s	(-) 0,67*

Las relaciones entre las variables más sensibles del test *ex vitro* e *in vitro* se midieron calculando los coeficientes de correlación mediante análisis de regresión simple (Tabla 1). El progreso de la enfermedad en ambos tests presenta correlaciones moderadamente altas y significativas.

La Figura 2 muestra que en los clones con un avance más rápido de la enfermedad que *C. sativa* (en rojo), el 75% de las muertes se da en los 25 primeros días. Serán los clones **muy sensibles**. En los clones con un avance menor que el de *C. crenata* (en verde), el 75% de los explantos tarda más de 50 d en morir (clones **resistentes**).

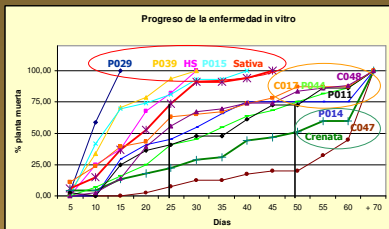


Figura 2. Velocidad de progreso de la enfermedad en el test *in vitro* para los 10 genotipos iniciales

¿En qué consiste el test *in vitro*? (Rial y col. 2007)

Test de inoculación del sustrato (*ex vitro*) (Robin y col., 2006)

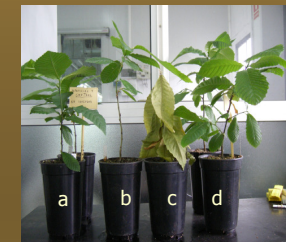


Foto 7. Test de inoculación del sustrato. a. Planta no inoculada del clon P014. b. Planta inoculada de P014 mostrando resistencia. c. *C. sativa* inoculado mostrando los síntomas de la enfermedad. d. *C. crenata* inoculado mostrando resistencia

Vitroplantas aclimatadas de una savia de los clones seleccionados, creciendo en macetas de 2 l con sustrato formado por turba y perlita (1:1), se inoculan en cámara controlada (4 repeticiones de 6 individuos) regando con 200 ml de solución que contiene, triturado, el micelio de *Phytophthora cinnamomi* en crecimiento en 25 ml de medio V8 (una placa de Petri).

Las variables que se consideraron en la comparación con el test *in vitro* fueron:

- * supervivencia (%)
- * nivel de daño en la raíz (necrosis)
- * circunferencia dañada en el cuello de la raíz (%)
- * progreso de la enfermedad como índice de %muertos/días transcurridos
- * % de reasamiento positivo en suelo y raíces para confirmar la muerte por tinta

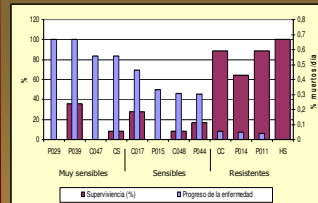


Figura 1. Progreso de la enfermedad y supervivencia en el test de sustrato de los 10 clones iniciales

Los resultados permiten agrupar los clones en tres categorías en función del progreso de la enfermedad, con *C. sativa* marcando el límite de los sensibles y *C. crenata* el de los resistentes.

Tabla 2. Resultados del test *in vitro* de resistencia a tinta para 41 clones de castaño

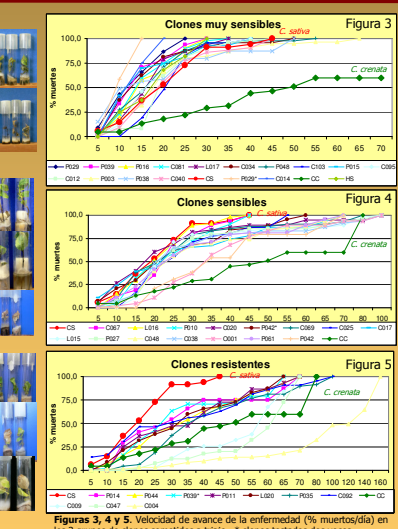
CLON	#BIEL. INOCULADOS	DÍAS AL 100% MUERTOS	%BIEL. POS EN TALLO	%BIEL. POS EN RAÍZ
C014	48	20	100,0	100,0
P029	44	25	25,0	
HS	60	30	48,3	
P015	70	30	28,6	
P016	84	30	35,7	
C013	44	30	68,2	
C044	44	32	97,9	93,2
C045	48	32	100,0	97,9
P011	42	35	100,0	91,2
C047	48	35	100,0	91,2
C048	48	40	97,9	85,4
C033*	48	40	97,9	87,5
C034*	48	40	97,9	87,5
C001	47	41	97,9	97,2
C067	48	43	95,8	91,5
C046	47	43	95,8	95,2
C040	43	45	85,1	86,2
P010	54	45	81,5	86,2
C025	31	46	96,8	100,0
P039	48	46	100,0	100,0
C042	48	46	100,0	100,0
P042	48	46	100,0	91,2
C029	31	46	100,0	100,0
C047	47	46	100,0	100,0
C017	46	50	85,2	85,2
C049	40	50	90,0	85,2
C048	43	50	85,1	85,2
P014	54	50	97,9	85,2
P014	44	50	81,8	85,2
P042	44	50	81,5	85,2
C044	54	50	97,9	85,2
CC	45	70	96,2	
C020	38	81	100,0	100,0
C069	42	83	97,6	100,0
C038	48	88	100,0	100,0
P047	48	88	100,0	100,0
P015	48	88	100,0	97,5
C092	43	94	100,0	100,0
C035	48	94	100,0	97,5
C001	47	94	100,0	100,0
C024	71	113	100,0	100,0

Triaje de los genotipos seleccionados en campo. Resultados y conclusión

Hasta el momento, se han pretestado por este procedimiento en el laboratorio de TRAGSA, 41 clones de castaño del país. Se incluyeron como testigos, *C. sativa*, *C. crenata* y el clon híbrido interespecífico resistente HS. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 2 y Figuras 3, 4 y 5. El día en que se alcanza el 75% de los muertos totales permite separar los clones en tres grupos (**muy sensibles**, **sensibles** y **resistentes**) que se asocian bien con el comportamiento del testigo sensible (*C. sativa*) y resistente (*C. crenata*). Sin embargo, se observan algunas incoherencias:

- Los clones P029, P039 y P042 fueron testados dos veces. P029 y P042 se colocaron en el mismo grupo de resistencia en ambas ocasiones mientras que P039 se colocó como muy sensible en una ocasión y como resistente en otra.
- Los resultados *ex vitro* concuerdan excepto para P044, C047 y uno de los test de P039, que *ex vitro* se comportan como sensibles (P044) y muy sensibles (C047 y P039) e *in vitro* se ubican en el grupo de los resistentes; y HS, que *ex vitro* es muy resistente e *in vitro* se ubica como muy sensible.

El test de resistencia *in vitro*, permite descartar los individuos sensibles en las primeras fases de la clonación, ahorrando tiempo y recursos. Las incoherencias encontradas sugieren repetir el test para esos clones (todos ellos fueron testados en 2007, cuando los parámetros a observar estaban menos claramente definidos) y confirmar resultados. En cualquier caso, los clones calificados *in vitro* como resistentes deberán confirmar este comportamiento *ex vitro*.



Figuras 3, 4 y 5. Velocidad de avance de la enfermedad (% muertes/día) en los 3 grupos de clones sometidos a triaje. * clones testados dos veces

